Original Articles Korean Circulation J 1998;28(8):1357-1371

흰쥐 경동맥 풍선손상 모델에서 리포좀 전달체를 이용한 에스트로겐의 국소전달 효과

연세대학교 의과대학 심혈관센터 심장내과,[1] 심혈관 연구소,[2] 임상의학센터[4]
원주대학교 보건대학 임상병리학과,[3]
윤영섭[1] · 장양수[1] · 정광회[2] · 박용석[3] · 김형관[4]
강웅철[1] · 권진욱[1] · 정보영[1] · 조상호[2] · 김성순[1]

The Effect of Estrogen Containing Liposome Local Delivery on the Neointimal Hyperplasia in the Rat Carotid Artery Balloon-Injury Model

Young-Sup Yoon, MD[1], Yangsoo Jang, MD[1], Kwang-Hoe Chung, PhD[2], Hyung Kwan Kim, MD[4], Yong-Suk Park, PhD[3], Woong-Chul Kang, MD[1], Jin-Wook Kwon, MD[1], Bo-Young Chung, MD[1], Sang-Ho Cho, MD[2] and Sung-Soon Kim, MD[1]

[1]Division of Cardiology & [2]Cardiovascular Research institute, Yonsei Cardiovascular Center, [4]Clinical Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, [3]Clinical Pathology, Department of Health Science, Wonju University, Wonju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Estrogen has been reported to inhibit migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. Sustained local delivery represents a potential alternative to systemic administration because it can achieve higher tissue drug levels at site of balloon injury avoiding systemic side effects. We investigated the effect and mechanism of nanoparticulate sustained-release carrier system using liposome incorporating 17 β-estradiol (E 2) on neointimal formation in rat carotid artery balloon injury model. **Materials and Methods** : 17-estradiol benzoate, egg phosphatidylcholine, cholesterol, polyethyleneglycol-phosphatidylethanolamine were mixed to produce E 2-liposome formula where the final concentrations of lipids and E 2 were 10 mg/ml and 66 M, respectively. The size of the particle was less than 200 nm. Rat carotid artery balloon injury model was used with Sprague-Dawley rats weighing 350±30g. Rats were divided into 3 groups of saline (n=22), liposome (n=46) and E 2-liposome (n=46) and received 0.2 ml of each agent at injured site. 1) Rats from all groups were sacrificed at 7 (n=4), 14 (n=6), and 21 (n=12) days after injury, respectively. Morphometric analysis was performed for calculating medial area, neointimal area and I/M (intimal area/medial area) ratio 2) Rats from liposome and E 2-liposome groups received 100 mg/kg of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) at 25, 9 and 1hr before sacrifice at 1 (n=4), 3 (n=4), 7 (n=4), and 14 (n=4) days after injury. BrdU and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) stains were performed to elucidate a mechanism of inhibitory effect of E 2. **Results** : 1) There was no increase in the neointimal area in liposome group compared with saline group at 7, 14, and 21 days after injury, respectively. 2) There was 17%, 30%, and 34% reduction of I/M ratio in E_2-liposome group compared with liposome group at 7, 14 and 21 days after

논문접수일 : 1998년 7월 0일
심사완료일 : 1998년 8월 21일
교신저자 : 장양수, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 심장혈관센타 심장내과
전화 : (02) 361 - 7266 · 전송 : (02) 393 - 2041
E - mail : Jangys1212@yumc.yonsei.ac.kr

injury, respectively. 3) BrdU and PCNA stain revealed that at day 3, labelling index (LI) of media was lower in E 2-liposome than in liposome group ($p<0.05$), and at day 7, LI of neointima was not significantly different between the two groups despite smaller neointimal area in the E_2-liposome group. **Conclusion** : Nanoparticulate liposome formula appears to be biocompatible. Local intraluminal infusion of E_2-liposome formula after balloon injury of rat carotid artery significantly decreased neointimal formation. The mechanism seems to be the inhibitory effect on the proliferative response of smooth muscle cells in media at an early stage of injury. This formula appears to show potential for clinical applications in the prevention of neointimal formation following balloon angioplsty. **(Korean Circulation J 1998;28(8):1357-1371)**

KEY WORDS : Rat carotid · Balloon injury · Local delivery · 17 β-estradiol, Liposome.

서 론

관상동맥 협착증의 치료로서 경피적 경혈관 관상동맥 풍선 확장 성형술(percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty, 이하 PTCA)은 전신마취 없이 시행할 수 있을 뿐 아니라 초기 시술 성공률이 95 %를 상회하므로 시술 건수가 지속적으로 증가하고 있다. 그러나 시술 후 6개월 이내에 30 50%에서 재협착이 발생하며[1)2)] 스텐트(stent) 삽입술 후에도 재협착율은 20%에 이르고 있다.[3)] 재협착의 기전에는 다양한 인자가 관여하는데 혈관 평활근 세포의 과도한 증식과 세포외 기질의 과도한 축적이 재협착을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다.[4-6)]

이러한 재협착을 방지하기 위하여 다양한 약물이 동물모델에서 시도되어 성공을 거두었으나, 임상시험에서는 재협착율을 감소시키지 못하였다.[7-9)] 이에 대한 이유로는 동물실험에 투여한 약물의 용량이 인체에는 과량에 해당되어 충분한 용량을 투여하지 못하였거나, 종간의 차이 등이 고려되고 있다. 이러한 한계를 극복하기 위한 방법 중 하나가 국소 약물 전달법으로서 이는 약물의 전신투여에 따른 부작용을 피하면서 풍선손상 위치에 고용량의 약물을 투여할 수 있어 조직내로의 약물 침투량을 증가시키는 효과적인 방법일 뿐 아니라 전달체의 성질에 따라 조직내에 잔류하면서 상당기간 약물을 방출하여 지속적인 약물 효과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 이러한 국소 약물 전달의 효과는 일부 연구에 의하여 이미 증명되어 있는데 혈관 외막주변(periadventitia)으로부터 약물을 전달하여 풍선손상 후 신생내막 증식을 상당히 억제하였다는 보고가 있다[10)11)]. 그러나 이 방법을 환자에 적용하기 위해서는 개흉수술을 통하여 혈관 밖으로부터 약물을 투여하여야 하므로 PTCA 후 재협착을 억제하는데 이용할 수는 없다. 또한 동물 실험에서 약물을 중합체(polymer)에 결합시켜 스텐트와 코팅하는 방법도 이용되고 있으나 유의한 효과를 증명하지 못하였다.[12)]

현재 혈관 내강을 통하여 약물을 전달하는 방법으로 국소 전달용 풍선 도자가 다양하게 개발되어 있는데[13)14)] 이들의 큰 단점은 혈관 내에 국소적으로 투입된 약물이 수분내지 수시간 내에 빨리 제거되므로 지속적인 약물 전달이 안되어 조직으로의 흡수율이 현저히 떨어진다는 점이다.[15)] 이러한 이유로 충분한 약물을 포함할 수 있으면서 지속적으로 약물을 분비할 수 있고 현재 이용 가능한 풍선 도자를 통해 주입이 가능한 nanometer 크기의 약물 전달체의 개발이 필수적이다. 현재까지 알려진 국소 약물 전달체 중 생체 분해성 물질인 polylactic-polyglycolic acid(이하 PLGA)는 흰쥐에서는 조직반응을 거의 유발하지 않으며, 혈관 내막의 증식을 억제한다고 보고된 바 있으나,[16)] 돼지를 이용한 실험에서는 PLGA를 스텐트에 부착하여 실험한 결과 상당한 조직반응 및 섬유세포 증식이 발생하는 것으로 밝혀져 더 많은 연구를 필요로 하고 있다.[17)]

리포좀은 유전자 치료의 전달체로 각광받는 물질로서 지질의 혼합체로 이루어지는데 그 성분을 조절함으로써 다양한 세포로 원하는 물질을 전달할 수 있다. 리포좀은 세포막과 유사한 구성으로 되어 있어 세포막 또는 endosome의 막과 융합을 유도하여 여러 물질을 세포질내로 전달하는 것으로 알려져 있다.[18-20)] 이러한 리포좀은 조직 반응을 상당히 적게 유발하며,[21)] 혈관 평활근 세포로의 침투가 가능하다는 것이 증명되었다.[22)] 실제 바이러스를 혼합시킨 리포좀이 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 oligodeoxynucleoside의 전

달에 성공하였다.[23]

국소전달 약물로는 다양한 약물이 연구되고 있는데 이중 에스트로겐은 인간에서 항죽상동맥경화(antiatherogenic) 효과가 있다고 알려져 있다.[24] 이러한 효과는 전신적인 효과인 혈청내 지질의 변화 뿐 아니라[25] 직접적인 국소적 혈관보호(vasoprotection) 작용에 의해 가능하다고한다.[26] 혈관 세포에 대한 에스트로겐의 직접적인 효과는 혈관의 긴장도에 빠르게(수십 분 이내) 영향을 주는 유전자를 통하지 않는(nongenomic) 효과와 에스트로겐 수용체를 통하여 혈관세포 유전자의 전사(replication) 및 세포 성장에 영향을 주는 유전자를 통한 효과(한 시간 이후)가 있으며 이를 통하여 동맥경화의 발생 및 진행을 억제함이 보고되었으며,[27][28] 인간 세포주 실험과 동물 실험결과 혈관 평활근 세포의 증식과 이동을 직접 억제하는 효과를 가짐이 알려져 있다.[29-33]

이에 연구자는 재협착의 주요 원인인 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동에 억제 효과를 가지고 있으나 아직은 혈관내 국소전달 방법이 개발되어있지 않은 에스트로겐과 약물의 전달체로 유용하다고 알려진 리포좀을 이용하여 에스트로겐-리포좀 혼합체를 제조하여 혈관 평활근 세포 증식의 동물 모델인 흰쥐 경동맥 풍선손상 모델에[34] 투여하여 억제 여부와 그 작용 기전을 알아봄으로써 향후 임상 적용의 타당성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

연구 고안

1단계 실험은 17β-에스트라디올(17β-estradiol)-리포좀(이하 E_2-리포좀) 복합체의 개발로서 다양한 조건하에서 리포좀을 17β-에스트라디올과 결합시켜서 nanometer의 크기로서, 세포배양을 이용한 예비 실험을 통하여 혈관 평활근 세포에 억제 작용을 지니며, 혼합물 내에서 결정화되지 않는 최대 농도의 17β-에스트라디올을 포함하는 E_2-리포좀을 개발하고자 하였다.

2단계는 개발된 리포좀 전달체의 생체 적합성을 시험하였다. 흰쥐 경동맥에 풍선손상을 가한 후 국소적으로 생리 식염수를 투여한 대조군과 리포좀을 투여한 군을 손상 후 7일(각 4마리), 14일(각 6마리), 21일(각 12마리)에 희생시켜 경동맥을 적출한 후 조직절편을 염색하여 광학현미경하에 관찰하여 신생내막 및 중막의 증식 정도를 비교하였다.

3단계는 리포좀만 투여한 군과 E_2-리포좀을 투여한 군을 손상 후 1일(각 4마리), 3일(각 4마리), 7일(각 4마리), 14일(각 6마리) 및 21일(각 12마리)에 희생시켜 경동맥을 적출한 후 조직절편을 염색하여 광학 현미경하에 관찰하여 신생내막 및 중막의 증식 정도를 비교하였다.

4단계는 E_2-리포좀 투여군에 5-bromo-2′-deoxyuridine(이하 BrdU)을 투여한 후 1일, 3일, 7일, 14일에 각각 4마리씩 희생하여 BrdU에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였으며 동일 조직을 대상으로 하여 proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA)에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 BrdU 염색과 비교하여 보았다(Fig. 1).

에스트로겐-리포좀 복합체의 제조

2 ml의 클로로포름(chloroform)/메탄올(methanol) 2 : 1(v/v) 혼합용매에 egg phosphatidylcholine, cholesterol, polylethyleneglycol-phosphatidylethanolamine, 17β-estradiol benzoate(Sigma Che-

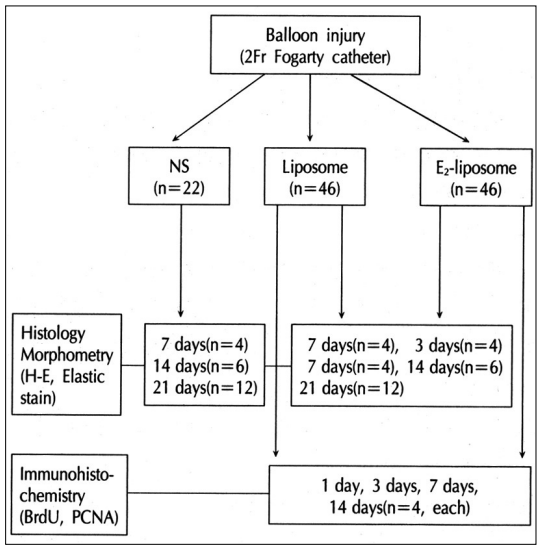

Fig. 1. Flow diagram of the study protocol. Common carotid artery injury was induced in Sprague-Dawley rats, followed by local infusion of normal saline, liposome, or E_2-liposome. The animals were sacrificed at different time points for morphometric analysis and immunohistochemistry. NS : normal saline treated group (sham control), Liposome : liposome (vehicle) treated group, E_2-liposome : 17β-estradiolliposome treated group. H-E stain : Hematoxylineeosin stain, elastic stain : Lawson's elasticvan Gieson stain.

mical Co., St. Louis, MO, USA)의 몰분율이 60 : 30 : 5 : 5의 혼합물 10 mg을 용해한 후 진공하에서 질소(N_2) 가스를 이용하여 용매를 증발시켰다. 이렇게 생성된 분말을 2 ml의 phosphate buffered saline(이하 PBS)에 용해시켜 교반한 후 1시간 동안 방치하였다. 이 용액을 5회 반복하여 냉동(dry iceethanol bath에서 3분) 및 해동(실온에서 10분)시켰다. 이를 0.4 m의 polycarbonate filter를 통하여 1회 압출(extrude)하고 다시 0.24 m의 polycarbonate filter를 통하여 10 회간 압출한 후 10 ml의 PBS에 희석시켰다. 이 용액에 HP-TLC plate(Merck Co, Munich, Germany)를 이용한 박막 크로마토그래피를 시행하여 17β-에스트라디올의 포함 정도를 정성적으로 확인하였다. 입자의 크기는 17β-에스트라디올-리포좀에 금분사(gold spurterring)로 코팅하여 주사 전자현미경(Hitachi, models-2700, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다.

실험 대상

기초 사육후 1주일간 환경에 적응시킨 체중 350±30 g 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 114마리를 상기 실험 계획에 따라 1군(생리 식염수 투여군) 22마리, 2군(리포좀 투여군) 46마리, 3군(E 2-리포좀 투여군) 46마리로 나누어 흰쥐 경동맥 풍선손상 방법(Clowes 등, 1983)을 이용하여 실험하였다.

경동맥 풍선손상 및 국소 약물주입

Ketamine(80 mg/kg)을 복강내로 투여하여 흰쥐를 마취한 후 경부 중앙 절개법으로 접근하여 좌측 총경동맥과 내경동맥 및 외경동맥의 분지부를 노출시켰다. 좌총경동맥 근위부와 내경동맥의 기시부를 수술사를 이용하여 일시적으로 결찰하였다. 외경동맥의 전벽을 일부 절개하여 2Fr Fogarty 풍선도자(Baxter Healthcare Corp, Irvine, CA, USA)를 삽입한 후 좌총경동맥의 결찰을 풀고 상행대동맥 방향으로 전진시켰다. 대동맥궁의 총경동맥 기시부에서 약간의 저항을 느낄 정도로(약 0.2 ml) 풍선도자를 팽만시켜 잡아당겨서 좌총경동맥 전체에 걸쳐 일정한 손상을 유발시켰다(Clowes 등, 1983 ; Villa 등, 1994). 이 과정을 3회 반복하여 혈관내피를 완전히 제거한 후 Fogarty 풍선도자를 제거하였다. PE 10 튜브를 Fogarty 도자를 제거한 자리에 다시 삽입하여 좌총경동맥의 중간부에 위치시킨 후 좌총경동맥의 중간부와 원위부, 내경동맥을 일시적으로 수술사로 결찰하였다. PE 10 튜브를 통하여 준비된 약물을 주입하였는데 2기압으로 1분간 주입하고 30 초간 쉬는 과정을 3회 반복(총 주입시간 4분)하여 총 주입액이 약 0.2 ml가 되도록 하였다. 국소 주입이 끝난 후 외경동맥에서 PE 10 튜브를 제거하고 외경동맥을 수술사로 영구결찰하였다. 총경동맥과 내경동맥의 일시 결찰을 풀고, 혈류를 재관류시켜 혈액이 총경동맥에서 내경동맥으로 관류하는 것을 확인한 후 절개부위를 봉합하였다.

관류 고정(Perfusion fixation) 및 형태계측 검사

손상 후 예정된 날짜에 ketamine(80 mg/kg)을 복강으로 주사하여 마취시킨 후 개복하여 복부 대동맥 분지부 바로 근위부에 18 gauge주사바늘을 삽입한 후 흰 쥐를 sodium pentobarbital(75 mg/kg)로 희생시켰다. 양측 경정맥을 절개한 후 대동맥을 통하여 생리식염수를 관류시켜 혈관계를 세척한 후 즉시 대동맥을 통하여 10% 포르말린을 120 mmHg의 압력으로 5분 동안 관류시켜 압력고정(pressure-fixation)을 시행하였다(Wilensky 등, 1995). 손상받은 좌총경동맥과 손상받지 않은 우총경동맥을 각각 적출하여 10% 포르말린 용액에 12시간 고정시킨 후 이를 파라핀에 포매시켰다. 약물 주입부 및 그 하부를 포함하여 4등분한 후 광학 현미경으로 관찰하여 가장 증식이 많이 된 부위 1/4 (0.3 cm)을 선택하여 3 μm 두께로 3개의 절편을 만들었다. 온전한 우총경동맥은 대조군으로 준비한다. 각 조직은 hematoxylineeosin 염색 및 Lawson′s elasticvan Gieson 염색법으로 염색하였다. 형태학 검사는 Image-Pro plus ver 2.0 for Windows 95(Media cybernetics, Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 수행하였다. 중막(media)의 면적, 신생내막(neointima)의 면적 및 신생내막 면적 대 중막 면적비(ratio of the neointimal area to the medial area, 이하 내막/중막 비)를 구하여 이를 비교하였으며 검사 수치는 가장 증식이 많이 된 부위에서 얻은 3개의 절편의 평균값으로 산출하였다.

BrdU 및 PCNA 면역조직화학 염색

흰쥐를 희생시키기 25시간, 9시간, 1시간 전에 BrdU(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 각각 100 mg/kg씩 꼬리 정맥으로 주입한다. 예정된 날

짜에 관류고정하여 흰쥐를 희생시킨 후 손상된 좌총경동맥과 손상받지 않은 우총경동맥을 적출하여 이 조직절편을 10% 포르말린에 12시간 고정시킨 후 파라핀에 포매시켰다. 이 절편을 xylene과 알코올로 수세하여 파라핀을 제거한 후 citrate 완충용액(pH 6.0)에 담가 microwave oven에서 20분간 처리하고, 이를 식힌 후에 증류수로 수세하였다. 이 조직을 50배로 희석시킨 항 BrdU 항체(anti-BrdU mouse monoclonal IgG) (DAKO A/S, Denmark)와 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 이 과정이 끝난 후에 DAKO LSAB^{+} kit (Da-ko Corp.,Carpinteria, CA, USA))에 포함된 bio-tinylated anti-mouse immunoglobulin과 1시간, pe-roxidase conjugated streptavidine과 1시간씩 차례로 반응시키고 PBS로 세척한 후 3-amino-9-et-hyl-carbazole로 발색시켰다. 대조염색으로는 hematoxy-lin을 이용하였으며, 광학현미경 하에서 관찰하였다.

PCNA 면역조직화학 염색은 BrdU로 염색한 조직과 동일한 조직절편을 대상으로 하여 시행하였으며, 일차 항체로 항 PCNA항체(Bimeda Corp, Foster, CA, USA)를 사용하여 BrdU 염색과 동일한 방법으로 시행하였다.

표지 지수(labelling index)는 (염색반응 양성 핵수/총 핵수)×100으로 표현하였으며 각 시간대에서 중막 및 신생내막의 표지 지수는 평균±표준오차로 표시하였다.

통계 분석

자료의 통계적 분석은 SPSS/PC 통계 소프트웨어를 이용하였으며 모든 자료는 평균±표준 오차로 나타내었다. 각 군간의 연속변수의 비교는 Student's t-test(n5) 또는 Wilcoxon ranksum test(n<5)로 검정하였으며 양측 검정상 p값이 0.05 이하인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

에스트로겐-리포좀 복합체

상기의 방법을 통하여 만들어진 리포좀에 17β-에스트라디올이 제대로 캡슐화(encapsulation)되어 있는지 정성적으로 확인하기 위하여 E_2-리포좀을 클로로포름, 메탄올, 증류수의 비가 1 : 6 : 4인 혼합 용매로 박막 크로마토 그래피를 시행하였다. 이러한 E 2-리포좀 복합체는 최종 농도가 1 ml당 250 μg의 17β-에스트라디올과 1 mg의 지질 혼합체이다. 이는 리포좀 내의 총지질농도 10 mg/ml, 17β-에스트라디올 농도 660 μM에 해당한다. 실험 동물에는 상기의 방법으로 제조한 리포좀 및 E_2-리포좀을 생리식염수에 10배로 희석시킨 후 투여하였다. 또한 주사 전자 현미경 소견으로 확인한 리포좀 및 E_2-리포좀의 크기는 200 nm 이하이었다(Fig. 2).

리포좀의 생체 적합성

풍선 손상 후 생리 식염수를 국소 투여한 생리식염수 투여군과 리포좀만 투여한 리포좀 투여군의 7일, 14일 및 21일의 경동맥 조직을 H-E 및 elastin 염색 후 시행한 형태 계측치를 비교한 결과 두 군간에 중막 및 신생내막의 면적 그리고 내막/중막 비는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$) (Table 1, Figs. 3 and 4)

에스트로겐-리포좀의 억제 효과

리포좀 투여군과, E_2-리포좀 투여군의 1일, 3일, 7일, 14일, 21일의 경동맥 조사을 H-E 및 elastin 염색 후 시행한 형태 계측치를 비교하였다. 1일에는 양군에서 신생내막 증식이 없었으며, 중막의 일부가 손상되었음을 확인할 수 있었으며, 3일에는 신생내막의 증식이 뚜

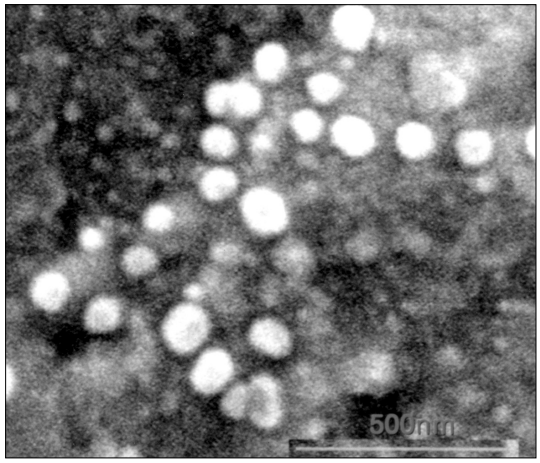

Fig. 2. Electron micrographs of liposome containing 17β-estradiol. The diameters of particles were less than 200 nm (×68,000). Bar=500 nm.

Table 1. Morphometric changes after local delivery of 17 β-estradiol in rat carotid artery after balloon catheter injury

Time	Groups	n	Media (mm^2)	Neointima (mm^2)	I/M ratio
7 days	NS	4	0.09±0.01	0.04±0.01	0.45±0.07
	Liposome	4	0.10±0.01	0.05±0.01*	0.46±0.08#
	E_2-liposome	4	0.10±0.01	0.04±0.01*	0.38±0.02#
14 days	NS	6	0.09±0.01	0.11±0.01	1.24±0.14
	Liposome	6	0.09±0.01	0.11±0.01†	1.25±0.13‡
	E_2-liposome	6	0.09±0.01	0.08±0.01†	0.87±0.14‡
21 days	NS	12	0.10±0.01	0.16±0.01	1.63±0.17
	Liposome	12	0.09±0.01	0.16±0.02$	1.66±0.18※
	E_2-liposome	12	0.09±0.01	0.11±0.01$	1.12±0.15※

Values are mean±SEM. NS : normal saline (sham control) group, Liposome : liposome (vehicle) group, E_2-liposome : 17 β-estradiol-liposome group, I/M ratio : intima/media ratio
*, #, †, ‡, $, ※ : each $p<0.05$ by t-test ($n\geq5$) or Wilcoxon rank-sum test ($n<5$)

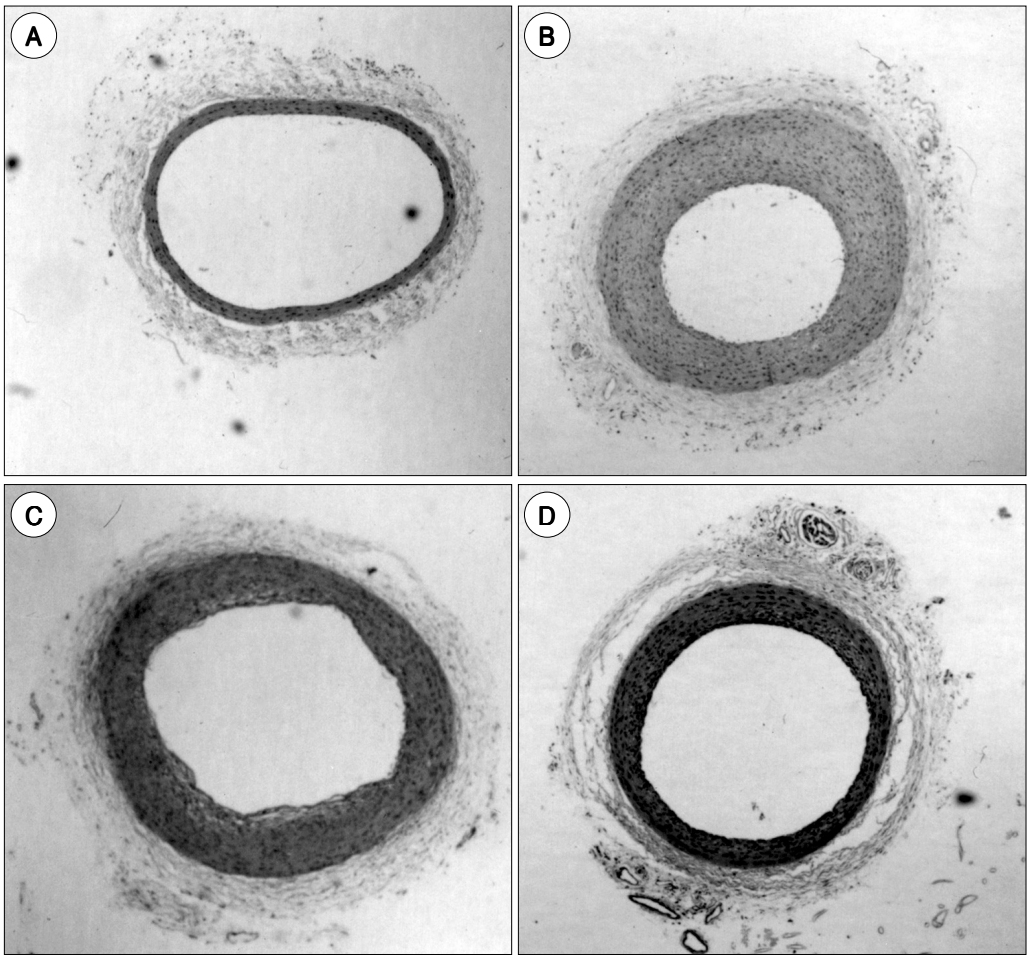

Fig. 3. Representative light micrographs of left common carotid arteries from normal and balloon injured rats 21 days after injury. A, normal ; B, normal saline-treated (sham control) ; C,liposome (vehicle)-treated ; D,17 β-estradiol-liposome-treated (Hematoxylineeosin stain, ×40).

렷하지 않아 신생내막의 면적을 비교할 수 없었으며, 중막의 면적(0.09±0.02 mm^2 vs 0.09±0.01 mm^2)은 양군간에 유의한 차이가 없었다. 7일, 14일 및 21일에는 양군간 중막의 면적은 유의한 차이가 없었으나, 신생내막 면적 및 내막/중막 비는 E_2-리포좀 투여군에서 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(Table 1, Fig. 3, Fig. 4). 내막/중막 비는 7일에는 17%, 14일에는 30%, 21일에는 34% 감소하였다. 손상 후 중막 면적은 1일부터 21일 사이에 양군 모두 유의한 변화 없이 일정하게 유지되었다.

신생내막 면적의 감소가 전신적인 약물의 효과가 아니고 국소 약물전달의 효과임을 증명하기 위하여 동일한 혈관 조직의 연속 절편을 제작하여 염색한 후 비교하였다(Fig. 5). 풍선 손상은 총경동맥 전체에 가해지게 되나 손상 받은 후 약물이 전달된 부위는 혈관의 원위부에 국한되며 총경동맥 근위부는 손상받은 후 약물이 전달되지 않은 상태이었다. 만일 약물의 효과가 전신적이었다면 양쪽 모두에서 동일한 정도의 신생내막 증식이 발생하였을 것이나 손상 후 14일의 조직을 염색해본 결과 약물이 전달되었던 원위부 혈관에만 신생내막 증식이 억제되는 소견을 나타내었다.

BrdU 및 PCNA 면역조직화학 염색 결과

리포좀 투여군과 E_2-리포좀 투여군에서 1일, 3일, 7

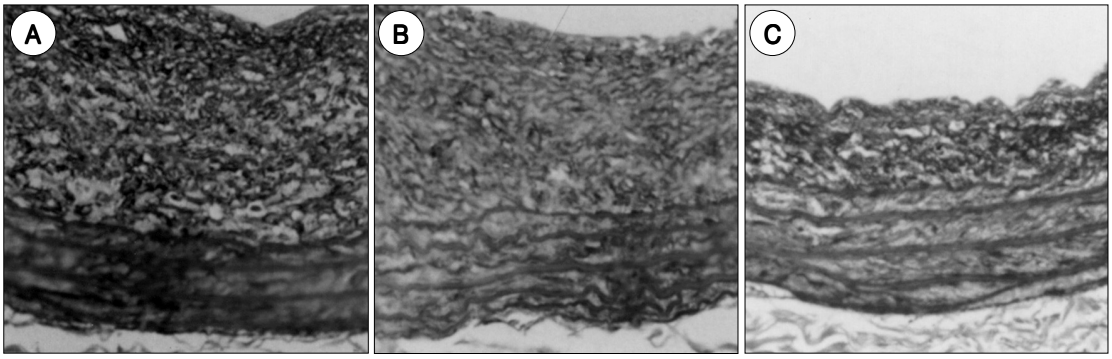

Fig. 4. Representative light micrographs of left common carotid arteries from normal and balloon injured rats 21 days after injury. A, normal saline-treated (sham control) ; B, liposome (vehicle)-treated ; C,17β-estradiol-liposome-treated (Lawson's elastic van-Gieson stain, ×400).

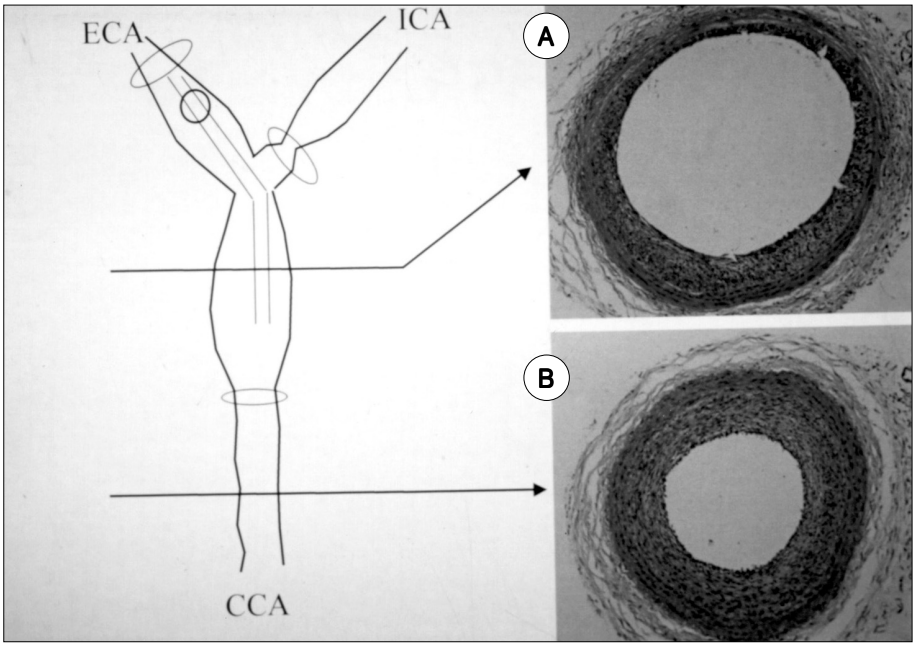

Fig. 5. Spatial distribution of the inhibitory effect of 17β-estradiol on media. Typical light micrographs of cross sections from treated (A) and untrated (B) segments of the left carotid artery of a rat are shown on the right (Hematoxylineeosin stain, ×100) and a schematic drawing of the rat carotid artery on local delivery after balloon injury is depicted on the left. CCA : common carotid artery, ECA : external carotid artery, ICA : internal carotid artery.

Table 2. Effects of 17β-estradiol on BrdU labelling index in media and neointima of rat carotid artery after balloon catheter injury at various times

		1 day	3 days	7 days	14 days
Liposome	Media	0.05±0.06	17.3±9.1*	3.2± 1.4	0.06±0.08
	Neointima	(-)	(-)	48.2±12.5	5.7 ±3.3
E_2-liposome	Media	0.04±0.06	3.61±2.5*	2.7± 1.6	0.05±0.05
	Neointima	(-)	(-)	43.3±13.3	5.4 ±2.8

Values are mean±SEM. Liposome : liposome (vehicle) group, E_2-liposome : 17β-estradiol-liposome group. BrdU was given intravenously at 100 mg/kg 25, 9 and 1h before sacrifice. Immunohistochemical detection of BrdU was performed using anti-BrdU mouse monocloncal antibody and peroxidase-labeled anti-mouse IgG.
(-) : undetectable, * : $p<0.05$

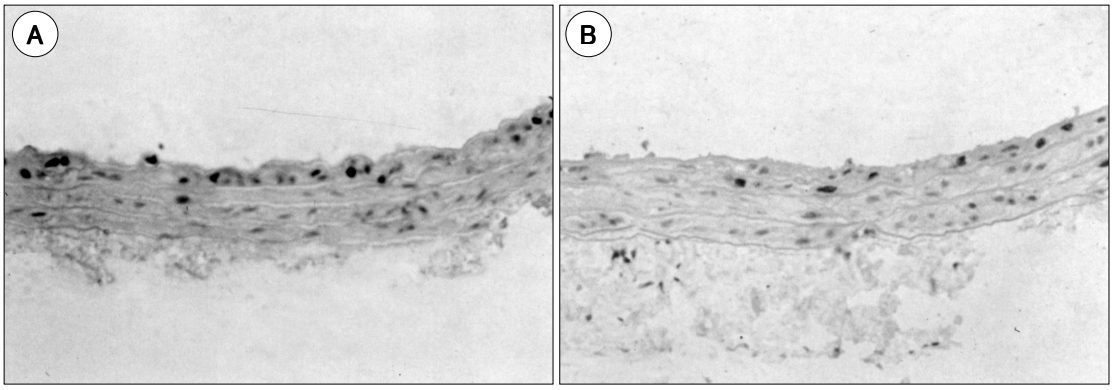

Fig. 6. Photomicrographs show nuclear incorporation of BrdU in arteries of rats 3 days after balloon injury and treatment with liposome (vehicle) (A) or 17β-estradiol-liposome (B) (Immunohistochemical stain for BrdU, ×200).

일, 14일에 각각 4마리씩 희생하여 중막 및 신생내막내에 BrdU의 핵내 침착 정도를 관찰하였다(Table 2). 리포좀 투여군과 E_2-리포좀 투여군의 손상 후 1일의 중막의 BrdU 표지 지수는 양군간에 유의한 차이가 없었다. 손상 후 3일에는 양군 모두 표지된 세포군이 주로 중막에서 관찰되었으며, E_2-리포좀 투여군의 중막의 BrdU 표지 지수가 유의하게 감소하였다(Fig. 6) ($p<0.05$). 손상 후 7일에는 양군 모두 표지된 세포군이 주로 신생내막에서 관찰되었으며, 신생내막의 BrdU 표지 지수 및 중막의 BrdU 표지 지수는 양군간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 7). 손상 후 14일에는 양군 모두 표지된 세포가 중막에서는 거의 관찰되지 않았으며, 신생내막의 BrdU 표지 지수는 양군 사이에 유의한 차이가 없었다.

리포좀 투여군과 E_2-리포좀 투여군에서 1일, 3일, 7 일, 14일에 각각 4마리씩 희생하여 중막 및 신생내막의 PCNA 염색을 시행한 결과 표지 지수는 각 시기별로 BrdU의 표지 지수와 비교시에 다소 높은 것으로 나타났으나(Table 3) 시간에 따른 변화 유형이 BrdU와 유사하게 나타나 BrdU 검사의 결과를 재확인 할 수 있었다.

고 찰

본 연구를 통하여 혈관내 전달을 위한 nanometer 크기의 리포좀 및 17β-에스트라디올-리포좀의 복합체를 개발하였으며 리포좀 내에 함유된 17β-에스트라디올은 박막 크로마토그래피에 의하여 정성적으로 확인할 수 있었다. 또한 경동맥 풍선 손상 후에 리포좀 복합체를 짧은 기간 동안 적정한 압력으로 혈관내로 국소 전달시에 흰쥐 경동맥 조직과 적합성이 있음을 보여 주었다. 이는 생리 식염수 투여군과 비교하여 풍선 손상 후 신생내막 증식의 정도에 차이가 없었으며, 유의한 염증반응이 관찰되지 않았던 점으로 판단할 수 있었다. 또한 리포좀과 에스트로겐의 복합체를 경동맥 풍선 손상 후 주입시 신생내막의 증식을 유의하게 감소 시켰는데 이는 손상 후 초기에 중막 세포의 활성화 및 증식을 억제함으로써 신생내막으로

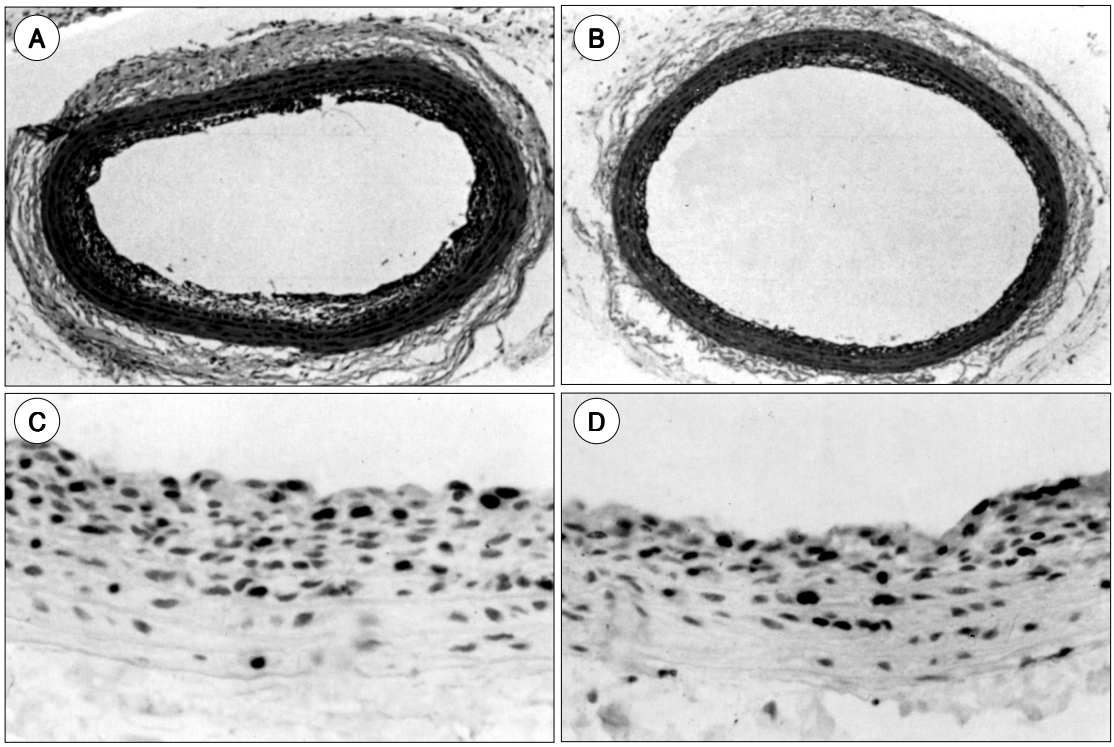

Fig. 7. Photomicrographs of arteries of rats 7 days after balloon injury and treatment with liposome (vehicle) (A, C) or 17β-estradiol-liposome (B, D). Hematoxyline-eosin staining (×100) is shown in panel A and B. Immunohistochemical staining for BrdU (×200) is shown in panel C and D.

Table 3. Effects of 17β-estradiol on PCNA (proliferating cell nuclear antigen) labelling index in media and neointima of rat carotid artery after balloon catheter injury at various times

		1 day	3 days	7 days	14 days
Liposome	Media	0.11±0.0	817.1±7.2*	5.3± 2.9	0.12±0.10
	Neointima	(-)	(-)	67.1±12.5	6.7 ±3.8
E_2-liposome	Media	0.09±0.07	6.7±2.8*	3.8± 1.8	0.10±0.11
	Neointima	(-)	(-)	64.3±10.6	6.1 ±4.2

Values are mean±SEM, Liposome : liposome (vehicle)group, E_2-liposome : 17β-estradiol-liposome group, (-) : undetectable, * : $p<0.05$

이동되는 세포수의 감소를 초래하여 신생내막 형성을 억제하였던 것으로 이해된다.

혈관 손상 후 협착

경피적 관상동맥 확장성형술 후 혈관 평활근 세포의 증식은 재협착 병변에서 중요한 역할을 하므로 이를 억제하면 재협착율을 줄일 수 있으리라는 발상에서 실험적인 동물 모델이 많이 연구되어 왔는데 그 중 대표적인 것이 흰쥐 경동맥 풍선 손상 모델이다.[34] 흰쥐 경동맥 풍선 손상 모델은 풍선 손상에 따른 혈관 내피세포의 완전한 박리 및 중막 세포의 상당한 죽음으로부터 반응이 시작되는데 첫 단계는 중막 평활근 세포의 증식 과정으로 혈관 손상 후 24시간 경과 시에 발생한다. 여기에는 basic fibroblast growth factor(이하 bFGF), angiotensin II(이하 ATII) 등이 관여한다고 알려져 있다.[35] 두번째 단계는 평활근 세포가 internal elastic lamina를 통과하여 내막을 형성하는 이주 과정으로 손상 후 4일째가 되면 시작되는데 그 지속 기간은 불분명하며 plateletderived growth factor(이하 PDGF), transforming growth factor(이하 TGF -), bFGF,

ATII 등이 관여한다. 세번째 단계는 일단 신생내막으로 이주한 평활근 세포가 수주 및 수개월에 걸쳐서 복제되는 단계로 이와 관련된 물질은 확실하게 알려진 바 없다. 흰쥐 경동맥 풍선손상 모델에서는 안지오텐신 전환효소 억제제, 칼슘 통로 차단제, 5-HT 길항제, 항혈소판제, 항응고제, 항염제, 지질강하제, 항산화제 등 상당수의 약물이 신생내막 증식을 억제하는 것으로 밝혀졌으나 실제 임상시험에서 중재술을 시행한 후 투여하여 재협착을 유의하게 감소시키지 못하였다.[36]

약물의 국소전달 및 약물 전달체로서의 리포좀

약물 투여에 대한 동물 실험과 임상시험의 차이는 실제 재협착 과정의 차이 및 종에 따른 약물 반응의 차이에서 기인할 수 있다. 그러나 동물실험에서 투여한 약물의 용량을 인체에 투여시에는 과량에 해당하여 전신적인 부작용을 초래할 수 있으며, 국소 병변에 약물이 효과적으로 도달하지 못하는 문제점이 있어 이를 극복하기 위한 새로운 시도가 약물의 국소 전달법으로서 고농도의 약물을 원하는 곳에만 전달함으로써 전신적인 부작용은 피하며 효과를 증대시키는 방법이다.[37] 그러나 선택된 약물을 단지 국소에 짧은 시간 주입하는 경우도 혈류에 의하여 약물이 급속히 제거되므로 혈관벽에 전달되는 약물의 양이 적으며 지속적인 약물의 효과를 기대할 수 없다. 동물 실험에서는 수술을 시행한 후 혈관 외막 주변으로부터 헤파린,[10] 덱사메타존,[11] c-myb oligonucleotides[38] 등의 약물 전달을 시도하여 성공을 거둔 바 있으나, 혈관을 노출시켜야 하는 방법이므로 임상적으로 적용하기에는 제한점이 있다. 반면 혈관 내로의 전달은 임상적으로 적용 가능한 방법으로 생각되나 이를 위해서는 국소 전달용 풍선도자의 개발이 필요하며, 약물이 혈관벽에 다량 흡수될 수 있는 방법 또는 혈관벽에 흡착되어 약물을 지속적으로 방출할 수 있는 전달체의 개발이 필수적이다.

약물 전달체는 몇 가지 조건을 만족시켜야 하는데 첫째로는 혈관 조직과 적합성을 가져야 한다. 이전의 보고들을 살펴 보면 조직 부적합성이 혈관내 약물 전달법의 가장 큰 장애물임
을 시사하는데, 생체내 안정성 중합체이든지 생체 분해성 중합체이든지 정도의 차이는 있으나 혈전형성 자극 및 염증 반응을 초래하는 것으로 나타나 있다.[17] 이미 약물의 전달 및 스텐트 코팅용으로 몇몇 중합체가 개발되어 동물 모델에서 시도되었으나 상당한 염증반응 및 내막 증식반응을 초래하여 실용성이 없는 것으로 여겨지고 있다.[17] 그러나 이중 생체 분해성 물질인 polyl-actic-polyglycolic acid(PLGA)는 흰쥐 경동맥 풍선손상 모델에서는 조직반응을 거의 유발하지 않으며, 덱사메타존과 결합하여 혈관내막 증식을 억제한다고 보고된 바 있고,[16] poly-L-lactic acid도 덱사메타존과 결합시켜 스텐트에 코팅한 연구에서 조직 적합성이 있음이 증명된 바 있으나 효과적인 증식 억제 효과는 얻지 못하였다.[12] 둘째로 이러한 전달체에 포함된 약물을 임상에서 이용하기 위해서는 이를 전달하기 위한 풍선도자의 pore를 통과할 수 있는 작은 크기의 전달체를 개발하여야 하는데 pore의 크기가 1 100 m이므로[14] nanometer 수준의 전달체를 개발하여야 한다. 셋째로 전달체는 생체내에서 분해되는 성질을 가져야 하며 넷째로 이러한 전달체는 약물을 충분히 함유할 수 있어야 한다.

리포좀은 약물 전달체로서 유용하다고 인정되는데 그 이유는 이 물질이 여러 생물학적 물질을 포함할 수 있으며 다양한 세포로의 전달이 가능하기 때문이다. 안과와 피부과 영역에서 임상적인 효능이 증명되었으며[39] 종양의 임상치료에도 도입된 상태이다.[40] 리포좀은 인공적인 지질의 이중막으로 구성되어 있으며 세포막과 융합하거나 수용체를 매개로한 endocytosis를 통하여 세포로 물질을 전달한다.[41] 이러한 리포좀은 제조가 비교적 쉬우며, 염증반응을 거의 유발하지 않고, 인체에 유해하지 않으며,[40] 크기에 제한없이 제조할 수 있는 장점이 있다. 현재까지 유전자 치료의 매개체로 유용성이 밝혀져 있으며 daunorubicin, paclitaxel의 국소전달에 이용되어 성공을 거두었다.[20][42] 단점으로는 낮은 전달력을 들 수 있는데 이러한 단점을 리포좀의 화학성분을 변경(예를 들면 불활성화된 일본 hem-agglutining 바이러스와의 결합)하여 극복하려는 시도가 성공을 거두고 있다.[22][23] 양전하를 띤 리포좀의 전이 효율은 세포군의 증식상태에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 토끼의 장골동맥에 풍선 확장술을 시행하여 내막에 혈관 평활근 세포가 증식된 경우 리포좀에 의한 유전자 전달이 증가한다고 한다.[43] 또한 손상된 세포를 통하여 전달이 더욱 잘 된다고 한다.[39] 이러한 점으로 판단하여 볼 때 리포좀은 혈관 손상 후 약물 전달체로서 충분한 잠재력이 있다. 본 연구에 이용

한 리포좀은 현재까지 개발된 약물 전달용 도자를 통과할 수 있도록 nanometer 크기로 제조하였으며 양전하를 띠게하였다. 리포좀에 포함된 17β-에스트라디올의 농도는 암컷 흰쥐의 혈중 생리적 농도의 40000배를 초과하는 농도로 생체외 실험에서 혈관 평활근 세포의 증식을 충분히 억제할 수 있는 농도에 해당하였다.[33] 그러나 기술적인 어려움으로 인하여 혈관 조직내에 리포좀 또는 17β-에스트라디올의 존재를 아직 증명하지 못한 점이다. 그러나 결과에서 언급한 바와 같이 약물이 국소적으로 작용하였다는 증거는 연속절편의 조직 비교로서 확인할 수 있었는데(Fig. 5) 약물이 전달되지 않은 부위의 조직 증식은 억제되지 않았던 점으로 이를 입증할 수 있었다.

에스트로겐의 효능

폐경 이전의 여성은 같은 연령대의 남성에 비하여 심혈관 질환의 발생율이 적으나 폐경 이후는 남성과 비슷해진다.[24)43)] 또한 폐경기 여성에서 에스트로겐 대치요법을 시행하면 그렇지 않은 여성에 비하여 관상동맥 질환의 정도가 경하며, 심혈관 질환에 의한 사망률이 감소한다.[43)] 이러한 항동맥경화 작용의 30 50%는 고밀도 지단백 콜레스테롤, 2형 고밀도지단백 콜레스테롤(HDL2), 아포지단백 A-1 등 혈장 지질의 변화에 따른 전신적인 효과로 설명될 수 있으나[44)] 나머지는 에스트로겐의 다른 효과에 의하여 발생하는 것으로 알려져있다. 이에는 내피세포의 저밀도 지단백 콜레스테롤 분해효과,[45)] 대식세포내 저밀도지단백 콜레스테롤에 대한 항산화효과,[46)] 교원질 및 elastin 합성의 억제효과[47)] 및 혈관 세포에 미치는 직접적인 효과 등이 있다.[48)]

임상에서 풍선 확장술 후 재협착의 억제에 관심이 모아지면서 동물 모델을 통한 에스트로겐의 내막증식 억제 효과가 많이 보고되었다. 토끼 대동맥 및 장골동맥에 대한 풍선 손상 후 17β-에스트라디올을 매일 투여한 경우 신생내막 증식이 50 70% 억제되었으며 이러한 효과는 혈관 평활근 세포의 억제에 기인한다고 보고하였다.[30)] 흰쥐 경동맥 풍선손상 모델을 이용한 실험에서는 신생내막의 증식이 암컷보다 수컷에서 많았으며, 정상 암컷에 비하여 성선제거술을 시행한 암컷에서 증가하였으며, 피하에 17β-에스트라디올 캡슐을 삽입하여 치료한 후에는 암수 모두 성선의 유무에 관계없이 약 60% 감소한 것으로 보고되었다.[49)] 이 결과는 혈관 손상 후 발생하는 신생내막 증식이 성에 따른 차이가 있으며, 이것이 에스트로겐에 기인한다는 점을 시사하고있다. 흰쥐 대퇴동맥 cuff 손상 모델을 이용한 연구[33)]에서도 성에 따라 신생내막 증식에 차이가 있으며 에스트로겐 대치요법이 신생내막 증식을 억제한다고 보고하였다. 또한 세포배양 실험을 통하여 17β-에스트라디올이 흰쥐 혈관 평활근 세포의 이주 및 증식을 농도에 의존적으로 억제하며 이는 prostanoid나 nitric oxide와 무관한 기전을 통하여 이루어진다고 하였다. 이 연구에서 17β-에스트라디올의 이주 억제농도는 1 100 nmol/l, 증식 억제농도는 0.01 100 nmol/l로 보고하였는데 10 nmol/l에서는 49%, 100 nmol/l에서는 68 % 억제된다고 밝혔다. 그 외에도 성선을 제거한 암컷 마우스의 경동맥에 철선(wire)으로 손상을 가한 후 생리적 수준(낮은 nanomole 농도)의 혈중 에스트로겐을 유지할 정도의 17β-에스트라디올을 투여하여 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하였다는 보고가 있는데, 이들은 생리적 수준의 에스트로겐 대치요법이 임상에서 풍선 확장술 후 재협착을 방지하는 역할을 할 수 있으리라고 제안하고 있다.[31)] 또한 남성 및 폐경 후 여성의 복재정맥에서 분리한 혈관 평활근 세포를 배양한 실험에서 17β-에스트라디올이 PDGF-BB 및 bFGF로 자극한 세포의 증식 및 이주를 성에 관계없이 억제한다고 밝혔다.[32)] 이 연구는 성장인자로 자극하지 않은 세포의 증식은 17β-에스트라디올이 억제하지 못한다고 밝히면서 17β-에스트라디올이 혈관 평활근 세포에 대한 성장인자의 효과를 특이적으로 방해한다고 제시하였다. 이 연구에서 이용한 17β-에스트라디올의 농도는 생리적 농도보다 높은 10^{-8} 10^{-6}M로 혈관의 급성반응을 억제한 농도[50)]와 유사한 수준이었다.

이러한 17β-에스트라디올의 항증식 및 항이주 효과에 대한 세포수준의 기전은 몇 가지로 설명되는데 현재까지 수용체를 통한 기전이 가장 많이 밝혀져있다. 돼지 관상동맥을 이용한 생체외 실험에서 17β-에스트라디올이 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하며 [^{3}H]-17β-에스트라디올이 세층의 혈관벽 세포질 및 핵에 균일하게 분포함을 보여주어 그 작용이 에스트로겐 수용체를 통하여 일어나는 것으로 추정하였다.[29)] 그 후 인간[26)] 및 흰쥐[51)]의 평활근 세포에서 에스트로겐 수용체가 존재함이 알려졌으며 남성 및 여성 관상동맥 환자의

혈관 평활근 세포에서 에스트로겐 수용체 mRNA와 단백질[52] 이 감소되어 있음이 증명되어 에스트로겐이 직접 평활근 세포의 기능을 조절함이 밝혀졌다. 결국 에스트로겐 수용체는 에스트로겐에 의하여 활성화되는 transcription factor로서 유전자의 표현을 조절함으로써 혈관 평활근 세포의 증식 및 이주를 억제한다는 것이다.

암컷 흰쥐의 혈청 에스트라디올 농도는 배란주기에 따라 30 500 pg/ml로 알려져 있다.[49)53)] 연구자가 투여한 17β-에스트라디올은 분자량 376.5 kDa로서 E2-리포좀내에서 약 66M의 농도를 가지며 이는 암컷 흰쥐 체내 농도의 40000배 이상에 이르는 농도이다. 이러한 에스트로겐의 용량은 예비실험을 통하여 결정하였는데, 리포좀과 결합시에 결정화되지 않는 최대 에스트로겐 농도로 선택하였으며, 예비실험으로 이 농도의 17β-에스트라디올을 첨가하여 혈관 평활근 세포를 배양하였을 때에 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

본 실험의 결과를 통하여 에스트로겐은 혈관에 직접 작용하여 신생내막의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었는데 현재까지 알려진 에스트로겐의 작용기전으로 이를 설명하면 첫째, 혈관 평활근 세포의 증식 억제, 둘째, 손상된 혈관의 증식에 기여하는 혈관 기질 성분의 생합성 및 침착의 억제[47)54)] 셋째, 손상 받은 혈관벽의 염증 반응 억제[55)] 등을 들 수 있다.

흰쥐 경동맥 풍선 손상 모델에서는 48 72시간 사이에 중막 평활근 세포의 30 40%가 증식반응에 관여하는데, 이들의 DNA 합성은 24시간 이내에 시작하여 2일에 최고에 이르며,[56)] 중막 평활근 세포는 수축형에서 합성형으로 변화를 거쳐, 손상 후 4일 경에 내막으로 이주하고, 7일 후에 신생내막내 세포 증식이 최고에 이른다고 알려져 있다.[34)] 손상 후 초기 반응인 혈관 평활근 세포의 증식이 직접 신생내막의 세포 축적에 기여하지는 않지만 이러한 초기반응이 궁극적으로 신생내막 병변을 유발하는데 필요하다고 알려져 있다.[57)] 손상 직후 bFGF 등의 증식인자[35)] 및 cytokine이 c-myc 등 초기 반응 유전자의 발현 및 DNA 합성을 유도하여 세포 증식 및 이주를 초래하는 것으로 알려져 있는데,[58)] 에스트로겐이 손상 후 수시간 이내에 혈관 평활근 세포의 c-myc의 표현을 감소시켜 증식을 억제함이 제시되었다.[49)] 또한 토끼 대동맥 손상 모델을 이용한 연구에서는,[30)] 풍선 손상 후 72시간 동안 에스트로겐을 투여한 결과 혈관의 thymidine 흡착이 억제되었으며 DNA의 양의 감소되었음을 보고하였
다. 본 연구에서는 S(synthetic)-phase 세포의 DNA 합성을 표지하는 BrdU 염색 결과 손상 후 3일에 중막내에 염색 양성인 세포가 감소하였음을 보여주었고 PCNA 염색 소견도 이와 유사한 결과를 나타내었으며 이는 중막내 혈관 평활근 세포중 DNA 합성이 활발한 증식중인 세포 수의 감소를 의미한다. 결국 이러한 결과는 에스트로겐이 중막내 혈관 평활근 세포의 활성화 및 증식을 억제하여 신생내막으로 이주되는 평활근 세포수를 감소시켜 후기에 발생하는 신생내막의 형성을 억제하였다는 것을 시사한다. 한편 최근 bFGF가 혈관 손상 후 혈관 평활근 세포의 초기 증식반응에 관여하는 주요 매개물질로 알려져 있으므로[59)] 에스트로겐이 이 물질과 관련되어 초기의 혈관 평활근 세포의 증식반응을 조절하였을 가능성도 있으므로 이러한 성장인자와의 연관성에 관한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

관상동맥 협착증의 치료법으로 경피적 관상동맥 확장성형술이 널리 시술되고 있으나 스텐트 삽입술이 도입된 이후에도 여전히 20%의 재협착율을 보이고 있다. 재협착의 여러 기전 중 혈관 평활근 세포의 증식은 주요 기전의 하나로 알려져있다. 재협착을 억제하기 위한 다양한 전신 약물 요법이 시도되었으나 동물모델에서만 성공을 거두었을 뿐 임상시험에서는 모두 실패하였다. 약물의 국소 전달법은 원하는 부위에 고농도의 약물을 전달할 수 있는 방법으로서 전신적 약물 투여에 따른 부작용을 최소화할 수 있어 중재술 후 재협착의 예방에 이용될 수 있는 하나의 대안으로 개발되고 있다. 본 연구는 동맥경화의 발생을 억제하며 혈관 평활근 세포의 증식 및 이주를 억제한다고 알려져 있는 에스트로겐을 약물 전달체인 리포좀을 이용하여 흰쥐 경동맥 풍선 손상 모델에서 국소 투여하여 신생내막 증식에 미치는 영향 및 그 기전을 알아보고자 하였다.

방 법 :

우선 약물 전달체로서 리포좀을 개발한 후, 이를 17β-에스트라디올(17β-estradiol)과 결합시켜 17β-에스트라디올-리포좀 복합체(이하 E_2-리포좀)를 제조

하여 실험에 이용하였다. E_2-리포좀은 egg phosphatidylcholine, cholesterol, polyethyleneglycol-phosphatidylethanolamine, 17β-에스트라디올을 혼합하여 최종 리포좀내 지질 농도가 10 mg/ml, 17β-에스트라디올 농도가 66M, 크기는 200 nm 이하가 되도록 제조하였다. 실험 동물로는 350±30 g의 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하여 생리적 식염수 투여군 22마리(1군), 리포좀 투여군 46마리(2군), E_2-리포좀 투여군 46마리(3군)의 세 군으로 나누었다. Ketamine (80 mg/kg)을 복강 내로 투여하여 마취시킨 후 좌경동맥에 2F Fogarty 풍선도자로 손상을 가하고, 손상을 가한 동맥의 원위부 및 근위부를 일시 결찰하여 해당 약물을 0.2 ml씩 3분에 걸쳐 동맥내강으로 투여하였다. 세 군 모두 손상 후 7일(4마리), 14일(6마리), 21일(12마리)에 관류고정으로 희생시켜 양측 경동맥을 적출한 후 H-E 염색 및 Lawson's elasticvan Gieson 염색을 시행하였다. 형태계측 검사로는 가장 증식이 많이 된 부위를 택하여 광학현미경하에서 측정하여 중막면적, 신생내막면적, 내막면적 대 중막면적의 비(내막/중막 비)를 구하였다. 또한 손상 후 1일, 3일, 7일, 14일에 2군과 3군에서 각 4마리씩 희생시켜 5-bromo-2′-deoxyuridine(BrdU) 염색 및 proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA) 염색법으로 신생내막 및 중막의 표지지수(labelling index)를 구하였다.

결 과 :

세 군 모두에서 유의한 염증반응이 관찰되지 않았으며, 생리 식염수 투여군과 리포좀 투여군 사이에는 손상 후 7일, 14일, 21일에 중막 및 신생내막 면적에 유의한 차이가 없었다. E_2-리포좀 투여군에서는 리포좀 투여군에 비하여 7일, 14일, 21일에 내막/중막 비가 각각 17%, 30%, 34% 감소하였다(각각 $p<0.05$). 손상 후 3일에는 리포좀 투여군보다 E_2-리포좀 투여군에서 중막의 BrdU 표지지수 및 PCNA 표지지수가 낮았다($p<0.05$). 손상 후 7일에는 E_2-리포좀 투여군에서 신생내막의 면적은 적었으나($p<0.05$) 양군간에 중막 및 신생내막의 BrdU 표지지수 및 PCNA 표지 지수에 유의한 차이가 없었다.

결 론 :

이상의 결과를 종합하여 볼 때 새로이 개발된 nanomemeter 크기의 리포좀은 국소 전달시에 흰쥐 경동맥 조직과 적합성이 있었으며, 풍선 손상을 가한 경동맥에 E 2-리포좀을 국소 투여한 결과 손상 후 초기에 중막의 혈관 평활근 세포의 활성화 및 증식을 억제하여 이후에 발생하는 신생내막의 형성을 간접적으로 억제하는 효과가 있어 향후 동맥의 풍선손상 후 발생하는 신생내막 증식의 억제에 이용될 수 있으리라 생각된다.

중심 단어 : 흰쥐 경동맥 · 풍선손상 · 국소전달 · 17β-에스트라디올 · 리포좀.

■ 감사문

본 연구에 도움을 주신 심혈관연구소 백금련 선생님, 병리학교실 송영민 선생님께 감사드립니다.

본 연구의 일부는 1997년 보건복지부 연구비의 보조로 수행되었다.

REFERENCES

1) Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. *Clinical trials of restenosis following coronary angioplasty. Circulation 1991; 84:1426-36.*
2) Hillegass WB, Ohman EM, Califf RM. *Restenosis: The clinical issue. In: Topol EJ, editor. Textbook of Interventional Cardiology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co;1994. p.415-35.*
3) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heindrickx G, *et al, for the Benestent Study Group. A comparison of balloon expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 1994;331:489-95.*
4) Safian RD, Gelbfish JS, Erny RE, Schnitt SJ, Schmidt DA, Baim DS. *Coronary atherectomy: Clinical, angiographic and histological findings and observations regarding potential mechanisms. Circulation 1990;82:69-79.*
5) Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, Horiuchi H, Nosaka H, Hamasaki N, *et al. Restenosis after PTCA: Pathological observations in 20 patients. J Am Coll Cardiol 1991;17:433-9.*
6) Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King SB III. *Coronary intimal proliferation after balloon angioplasty and stenting in swine: An animal model of restenosis. J Am Coll Cardiol 1992; 6:369-75.*
7) Pepine CJ, Hirshfeld JW, Macdonald RG, Henderson MA, Bass TA, Goldberg S. *A randomized trial of corticosteroids for the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Circulation 1990;81:1753-61.*
8) O Keefe JHJ, McCallister BD, Bateman TM, Kuhnlein DL, Ligon RW, Hartzler GO. *Ineffectiveness of colchicine for the prevention of restenosis after coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol 1992;19:1957-60.*
9) Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinki AS, King SB, Ivanhoe R, *et al. Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. N Engl J Med 1994; 331:1331-7.*
10) Edelman ER, Adams DH, Karnovsky MJ. *Effect of*

controlled adventitial heparin delivery on smooth muscle cell proliferation following endothelial injury. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:3773-7.

11) Villa AE, Guzman LA, Chen W, Golomb G, Levy RJ, Topol EJ. *Local delivery of dexamethasone for prevention of neointimal proliferation in a rat model of balloon angioplasty. J Clin Invest 1994;93:1243-9.*
12) Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ, Topol EJ. *Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. J Am Coll Cardiol 1997; 29:808-16.*
13) Lambert C, Leone J, Rowland S. *Local drug delivery catheters: Functional comparison of porous and microporous designs. Coron Artery Dis 1993;4:469-75.*
14) Lincoff AM, Topol EJ, Ellis SG. *Local drug delivery for the prevention of restenosis: Fact, fancy, and future. Circulation 1994;90:2070-84.*
15) Fernandez-Ortiz A, Meyer BJ, Maihac A, Falk E, Badimon L, Fallon JT, *et al. A new approach for local intravascular drug delivery: Iontophoretic balloon. Circulation 1994;89:1518-22.*
16) Guzman LA, Labhasetwar V, Song C, Jang Y, Lincoff AM, Levy R, Topol EJ. *Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticle: A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. Circularion 1996;94:1441-8.*
17) van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HMM, Serruys PW, Holmes Jr DR, *et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymer in porcine coronary arteries. Circulation 1996;94:1690-7.*
18) Farhood H, Serbina N, Huang L. *The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta 1995;1235:289-95.*
19) Wrobel I, Collins D. *Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. Biochim Biophys Acta 1995;1235:296-304.*
20) Forssen EA, Male-brune R, Adler-Moore JP, Lee MJA, Schmidt PG, Krasieva TB, *et al. Fluorescence imaging studies for disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue. Cancer Res 1996;56:2066-75.*
21) Stewart MJ, Plautz GE, Del Bueno L, Yang ZY, Xu L, Gao X, *et al. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: Safety and acute toxicity in mice. Hum Gene Ther 1992;3:267-75.*
22) Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. *Novel and effective gene transfer technique for study of vascular renin angitensin system. J Clin Invest 1993; 91:2580-5.*
23) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, von der Leyen H, Zhang L, *et al. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense c-myc 2 kinase oligonucleotides. J Clin Invest 1994;93:1458-64.*
24) Colditz GA, Wilett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. *Menopause and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 1987; 316:1105-10.*
25) Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. *Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. N Engl J Med 1994;325:1196-204.*
26) Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. *Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. Circulation 1994;89:1943-50.*
27) Clarkson TB, Anthony MS, Klein KP. *Effects of estrogen on arterial wall structure and function. Drugs 1994; 47(Suppl 2):2-51.*
28) Mendelsohn ME, Karas RH. *Estrogen and the blood vessel wall. Curr Opin Cardiol 1994;9:619-26.*
29) Vargas R, Wroblewska B, Rego A, Hatch J, Ramwll PW. *Oestradiol inhibits smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. Br J Pharmacol 1993;109:612-7.*
30) Foegh ML, Asotra S, Howell MH, Ramwell PW. *Estradiol inhibition of arterial neointimal hyperplasia after balloon injury. J Vasc Surg 1994;19:722-6.*
31) Sullivan TR, Karas RH, Aronovitz M, Faller GT, Ziar JP, Smith JJ, *et al. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. J Clin Invest 1995; 96:2482-8.*
32) Dai-Do D, Espinosa EM, Liu G, Rabelink TJ, Julmy F, Yang Z, *et al. 17β-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: Similar effects in cells from postmenopausal females and in males. Cardiovasc Res 1996;32:980-5.*
33) Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Kozaki K, Inoue S, Ishikawa M, *et al. Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: Effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis 1997;130:1-10.*
34) Clowes AW, Reidy MA, *Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab Invest 1983; 49:327-33.*
35) Lindner V, Reidy MA. *Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:3739-43.*
36) Franklin SM, Faxon DP. *Pharmacologic prevention of restenosis after coronary angioplasty: Review of the randomized clinical trials. Coron Artery Dis 1993;4:232-42.*
37) Langer. *New methods of drug delivery. Science 1990; 249:1527-33.*
38) Simons M, Edelman E, DeKeyser J-L, Langer R, Rosenberg R. *Antisense c-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. Nature 1992;359:67-70.*
39) Schmid MH, Korting HC. *Liposomes: A drug carrier system for topical treatment in dermatology. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1994;11:97-118.*
40) Nabel GH, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, *et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biological activity, and lack of toxicity in humans. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:11307-11.*
41) Felgner PL, Gladek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, *et al. Lipofection:A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:7413-7.*
42) Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, *et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro*

and in vivo using local drug delivery. irculation 1997; 96:636-45.

43) Belchetz PE. *Hormonal treatment of postmenopausal women. N Engl J Med 1994;330:1062-71.*

44) Takeshita S, Gal D, Leclerc J, Pickering JG, Riessen R, Weir L, *et al. Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation. J Clin Invest 1994;93: 652-61.*

45) Bush TL, Barrett-Connor E. *Noncontraceptive estrogen use and cardiovascular disease. Epidemiol Rev 1985;7: 89-104.*

46) Alexander JJ, Hoenig M, Graham D, Imbembo AL. *The effect of estrogen on low-density lipoprotein binding kinetics in aortic endothelial cells. Surgery 1989;106:386-91.*

47) Rifici VA, Khachadurian AK. *The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17 β-estradiol. Metabolism 1992;41:1110-4.*

48) Fischer GM, Swain ML. *Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. Atherosclerosis 1985;54:177-85.*

49) Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. *Nongenomic effect of estrogen and the vessel wall. Biochem Pharmacol 1996;51:571-6.*

50) Chen SJ, Li H, Durand J, Oparil S, Chen YF. *Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. Circulation 1996;93:577-84.*

51) Collins P, Rosano MC, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CM, *et al. 17 β-estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. Circulation 1995; 92:24-30.*

52) Bayard F, Clamens S, Meggetto F, Blaes N, Delsol G, Faye JC. *Estrogen synthesis, estrogen metabolism and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. Endocrinology 1995;136:1525-9.*

53) Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. *Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. Circulation 1994;89:1501-10.*

54) Legan SJ, Coon GA, Karsch FJ. *Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. Endocrinology 1975;96:50-6.*

55) Beldekas JC, Smith B, Gerstenfeld LC, Sonenshein GE, Franzblau C. *Effects of 17 β-estradiol on the biosynthesis of collagen in cultured bovine aortic smooth muscle cells. Biochemistry 1981;20:2162-7.*

56) Frazier-Jessen MR, Kovacs EJ. *Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophages. J Immunol 1995;154:1838-45.*

57) Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA. *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III: Endothelial and smooth muscle cell growth in chronically denuded vessels. Lab Invest 1986;54:295-303.*

58) Yue T, Wang X, Stadel JM, Feuerstein GZ. *Vascular smooth muscle cell migration, integrin adhesion receptors, and neointimal formation in restenosis. In: Feuerstein GZ, editor. Coronary restenosis. From genetics to therapeutics, 1st ed. New York: Marcel Dekker;1997. p.69-83.*

59) Ullrich A, Schlessinger J. *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 1990;61:203-12.*

60) Olson NE, Chao S, Lindner V, Reidy MA. *Intimal smooth muscle cell proliferation after balloon catheter injury: The role of basic fibroblast growth factor. Am J Pathol 1992;140:1017-23.*